

ÜBER DIE ISOLIERUNG VON PORPHYRIN-METHYLESTERN AUS KNÖLLCHEN VON LUPINUS LUTEUS

Von B. MATKOVICS, K. TÁRNOKI¹ und GY. NÉMETH²

Institut für organische Chemie der Universität Szeged

(Eingegangen am 27. März 1958)

Es ist Verfassern zum ersten Mal gelungen, aus den, den atmosphärischen Stickstoff bindenden Knöllchen von *Lupinus luteus* die den schon bekannten Porphyrin-Methylestern nahestehenden Porphyrin-Methylester in chemisch reiner Form zu gewinnen. Diese Porphyrinester dürften Zwischenprodukte des vermutlich sehr lebhaften Porphyrinstoffwechsels der Knöllchen sein. Die Einordnung der in Gestalt von Methylestern isolierten Porphyrine in die zahlreiche Familie der natürlichen Porphyrine ist noch im Gange.

Nach einer Mitteilung von KUBO aus dem Jahre 1939 [1] enthalten sämtliche Leguminosen ein Hämoprotein, welches auf die in den Knöllchen lebenden Rhizobien atmungssteigernd wirkt. Seines Erachtens spielen die Knöllchen-Hämoproteine in der Speicherung und Übertragung des Sauerstoffs eine wichtige Rolle. Das Spektrum des Hämoproteins steht dem des Blut-Hämoglobins am nächsten. Später hat VIRTANEN [2], [3] mit seinen Untersuchungen neuere Beiträge in Bezug auf das Hämoprotein der Sojabohnen-Wurzelknöllchen geliefert. VIRTANEN und Mitarbeiter [4]—[6] haben neben zahlreichen physikochemischen Eigenschaften des Leghämoglobins auch die Rolle des Hämoproteins bei der Bindung des atmosphärischen Stickstoffs untersucht und festgestellt, daß diejenigen Knöllchen, welche dieses Hämoprotein nicht besitzen, zur Bindung des atmosphärischen Stickstoffes unfähig sind [7]. Zur gleichen Zeit geben KEILIN und WANG [8] die spektroskopischen Daten ausführlich an und beschreiben die Isolierungsmethode des Hämoproteins der Sojabohnenknöllchen.

Einige Jahre später berichtet KLÜVER [9], [10], daß die Wurzelknöllchen der Leguminosen bei 620 m μ ein intensives Fluoreszenz- und Absorptionsmaximum aufweisen. Er konnte aus Sojabohnenwurzelknöllchen ein dem Coproporphyrin sehr nahestehendes Porphyrin, und aus den Wurzelknöllchen des *Phaseolus vulgaris* (Var. red kidney bean) ein Porphyrin mit von den bisher beschriebenen abweichenden Eigenschaften isolieren [11]. Das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des freien Porphyrins und des Porphyrin-

¹ Die Diplomarbeit von Klara Tárnoki war diesem Thema gewidmet.

² Gegenwärtige Anschrift: Landwirtschaftliche Versuchsanstalt Nyirtelek, Ungarn, Gyulatanya.

esters steht dem des Coproporphyrins näher, während sie in ihrer Löslichkeit eher dem Waldenströmschen Uroporphyrin ähneln. Mittels Chromatographie an einer CaCO_3 -Säule konnte das über die genannten Eigenschaften verfügende Legcoporphyrin in zwei Komponenten zerlegt werden. Es gelang diesem Autor auch, die Protoporphyrin- und Mesoporphyrinester aus den Häminmolekülen dieser Knöllchen zu isolieren.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß die den atmosphärischen Stickstoff bindenden Knöllchen eine breite Skala der Porphyrine enthalten. KLÜVER [10] spricht diesen Porphyrin + Hämoproteinsystemen in der Bindung des atmosphärischen Stickstoffs eine wichtige Rolle zu.

LITTLE [12] kommt bei seiner Kritik der bei der Untersuchung der Pigmentstoffe der Sojabohnen bisher erzielten Ergebnisse auf Grund von vergleichenden Untersuchungen zu der Schlußfolgerung, daß der Porphyrinanteil des Hämoproteins der Sojabohnenknöllchen mit dem Protoporphyrin-IX-dimethylester identisch ist.

Andere Autoren [13] waren imstande Protohäm-in-IX-Pyridinhämochromogen unter Verwendung von C^{14} -Glycin aus den Sojawurzelknöllchen zu gewinnen.

Es sprechen also alle Anzeichen dafür, daß die Hämoproteine und die Bindung des atmosphärischen Stickstoffs nebeneinander vorkommen. Betreffs der biochemischen Rolle derselben in der Bindung des atmosphärischen Stickstoffs sind wir nur auf Vermutungen angewiesen.

Unsere Versuche bezweckten in erster Linie die Trennung der Porphyrine von den atmosphärischen Stickstoff bindenden Knöllchen von *Lupinus luteus* bzw. das Einreihen dieser Porphyrine in die Gruppen der bereits bekannten Porphyrinester.

Es wurden verschiedene Versuche zur Trennung der Porphyrinester der *Lupinus luteus*-Knöllchen unternommen, hier sollen aber nur die Analysendaten der den in der Literatur angegebenen, spektroskopisch identifizierten Porphyrinestern am nächsten stehenden Verbindungen angeführt werden.

Die Substanz (XXXII) wurde durch Extraktion mit Aceton-Eisessig aus den Wurzelknöllchen von *Lupinus luteus* gewonnen und nach der bei der Häminbereitung angegebenen Methode [15] aufgearbeitet.

Analyse des Porphyrin-Methylesters :

C: 65,18%
 H: 7,26%
 N: 13,58%
 O: 13,32%
 Fe: in Spuren
 Asche: 0,66%

Hieraus ergibt sich die Gesamtformel: $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_4\text{N}_4$.

Mit der Gesamtformel des Protoporphyrin-Dimethylesters: $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{O}_4\text{N}_4$, des Mesoporphyrin-Dimethylesters: $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{N}_4$ oder des Deuteroporphyrin-Dimethylesters: $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_4$ verglichen, dürfte diese Substanz wohl dem letzteren am nächsten stehen.

Experimenteller Teil

Meistens erhielten wir die Knöllchen von *Lupinus luteus* solcherweise, daß die in Blüte stehenden Stauden 10 cm oberhalb der Wurzel abgeschnitten waren. Diese durch Wasser von der Erde bereits gut befreiten Wurzeln wurden von den Knöllchen abgetrennt und dann die Knöllchen in Gegenwart von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ und etwa 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in der Hammermühle zerkleinert. Nun wurden die gemahlenen Knöllchen mit dest. Wasser (1000 ml/kg Substanz) versetzt, bis zu 50 %, nach Abzentrifugieren des Niederschlages bis zu 75 % mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gesättigt und dann die Niederschläge der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fraktionen sowie die gesamte Knöllchenmasse zwecks Isolierung des Porphyrins aufgearbeitet. Die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fraktionen wurden der klassischen Extraktion mit NaCl- oder KCl-Eisessig unter 6—8-stündigem Rückfluß des Eisessigs unterworfen. Der dabei entstehende Niederschlag wurde abfiltriert und die Eisessiglösung eingedampft. Der abfiltrierte Niederschlag war vollkommen farblos, hatte also seinen gesamten Porphyringehalt verloren. Der Rückstand der eingedampften Eisessiglösung wurde in 60 %-igem Aceton aufgenommen, welches auch noch 0,02 % Salzsäure enthielt [12]. Der ungelöste Anteil wurde abfiltriert und durch Infrarotbestrahlung getrocknet, die Acetonlösung 4-mal mit je 100—150 ml Chloroform extrahiert, der Chloroform extrakt über MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Der entwässerte Rückstand war einer Esterifizierung zugänglich; diese wurde auf drei verschiedenen Wegen versucht [16], [17], [18], von denen sich die Ameisensäure-Eisenstaub-Methode [18] am besten bewährte. Oft war allerdings auch durch diese energische Eisenentziehung kein vollkommen eisenfreies Endprodukt zu erhalten und die gewonnene Substanz enthielt meistens 0,6 % Asche.

Auf die Eisenabspaltung erfolgte die Esterifizierung, wobei wir uns des absol. Methanol-Salzsäure- und des Diazomethan-Verfahrens bedienten. Das Endprodukt wurde aus methanolhaltigem Chloroform umkristallisiert.

Bei der Isolierung der natürlichen Porphyrine liefern die üblichen physikalischen Konstanten meistens keine zuverlässigen Daten bezüglich der Zugehörigkeit der Substanzen [19], weshalb wir uns bei der Isolierung in erster Linie auf die Analysendaten und die Ergebnisse der Spektraluntersuchungen stützten.

Das freie Porphyrin der Knöllchen von *Lupinus luteus* wurde mit aethylacetathaltigem Eisessig extrahiert [20], mit 5 %-iger Salzsäure durchgeschüttelt und dabei ein freies Porphyrin mit Absorptionsmaxima bei 565, 530, 518 und 495 m μ erhalten. Die 5 % Salzsäure enthaltende Lösung war intensiv rosafarbig und zeigte im UV-Licht eine starke Fluoreszenz, sie enthielt schätzungsweise 4000 γ /ml Porphyrin. Ihr Absorptionsspektrum steht dem des Coproporphyrins am nächsten.

Bei der weiteren Untersuchung der Frage denken wir uns der von MORRISON und STOTZ [21] beschriebenen chromatographischen Methode zu bedienen.

* * *

An dieser Stelle möchten wir Herrn Dr. J. HIRES für die Durchführung der Spektraluntersuchungen und unseren Mitarbeitern in der Mikroanalytischen Abteilung für ihre präzise Arbeit unseren Dank aussprechen.

Literatur

- [1] Kubo, H.: Acta Phytochim. (Japan) **11**, 195 (1939).
- [2] Virtanen, A. I.: Nature **155**, 747 (1945).
- [3] Virtanen, A. I., J. Erkama, H. Linkola: Acta Chem. Scand. **1**, 90, 861 (1957).
- [4] Ellfolk, N., A. I. Virtanen: Acta Chem. Scand. **4**, 1014 (1950).
- [5] Ellfolk, N., A. I. Virtanen: Acta Chem. Scand. **6**, 411 (1952).
- [6] Sternberg, H., A. I. Virtanen: Acta Chem. Scand. **6**, 1342 (1952).
- [7] Virtanen, A. I.: Biol. Rev. **22**, 239 (1947).
- [8] Keilin, D., Y. L. Wang: Nature **155**, 227 (1945).
- [9] Klüver, H.: Fed. Proc. **7**, 66 (1948).
- [10] Klüver, H.: J. Psychology **25**, 331 (1948).
- [11] Klüver, H.: Fed. Proc. **8**, 86 (1949).
- [12] Little, H. N.: J. Amer. Chem. Soc. **71**, 1973 (1949).
- [13] Richmond, I. E., K. Salamon, S. Caplin: Nature **174**, 34 (1954).
- [14] Egle, K., H. Mundig: Biol. Zbl. **73**, 37 (1954).
- [15] Chu, T. C., Edith Ju-Hwa-chu: J. Biol. Chem. **212**, 1 (1955).
- [16] Morell, D. B., M. Stewart: Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. **34**, 211 (1956).
- [17] Paul, K. C.: Acta Chem. Scand. **4**, 1221 (1951).
- [18] Fischer, H., B. Pützer: Z. physiol. Chem. **154**, 39 (1926).
- [19] Ramsey, V. G.: Biochemical Preparations (John Wiley and Sons Inc., New York, 1953). Vol. 3, S. 39.
- [20] Lucas, J., J. M. Orten: J. Biol. Chem. **191**, 287 (1951).
- [21] Morrison, M., E. Stotz: J. Biol. Chem. **228**, 123 (1957).